

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



11 Veröffentlichungsnummer: **0 489 332 A1**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 91120111.9

51 Int. Cl. 5: **C12N 5/00, C12N 5/06**

22 Anmeldetag: 26.11.91

30 Priorität: 01.12.90 DE 4038397

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
10.06.92 Patentblatt 92/24

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Anmelder: **BOEHRINGER INGELHEIM KG**

W-6507 Ingelheim am Rhein(DE)
84 BE CH DE DK ES FR GR IT LI LU NL SE AT

71 Anmelder: **BOEHRINGER INGELHEIM
INTERNATIONAL G.M.B.H.**

W-6507 Ingelheim am Rhein(DE)
84 GB

72 Erfinder: **Kutsch, Horst, Priv. Doz. Dr. habil.
Dillinger Strasse 27
W-6690 St. Wendel 1(DE)**

54 **Mikrocarrier für verankerungsbedürftige Zellen.**

57 Die Erfindung betrifft einen Mikrocarrier aus ausschließlich biologischem Material für lebende Zellkulturen.

EP 0 489 332 A1

Die Erfindung betrifft ein modifiziertes Trägermaterial als Mikrocarrier für verankerungsbedürftige Zellen, insbesondere für Säugerzellen.

Nach dem Stand der Technik war es bekannt, für verankerungsbedürftige Zellen Träger mit Glas- oder Kunststoffoberflächen zu verwenden. Das Scale-up wird dabei durch einfaches Vergrößern der Oberflächen erreicht.

Seit 1967 werden alternativ Mikrocarrier zur Anzucht und Kultur von verankerungsbedürftigen Zellen eingesetzt. Als Trägermaterial dienen verschiedene Materialien (Glas, Kunststoffe, vernetzte Polysaccharide). Die Adhäsion wurde durch chemische Modifikation der Trägeroberflächen entscheidend verbessert. In den meisten Fällen wird dazu Collagen kovalent an die Oberflächen der Träger gebunden. Das Scale-up im Falle von Mikrocarriern erfolgt durch einfache Zugabe frischen Trägermaterials; dabei erfolgt eine Zellwanderung von bereits besiedelten Carriern hin zu den frischen Trägern.

Erfindungsgemäß wird eine neue Klasse von derivatisierten vesikulären Materialien (ZSM = zellstrukturiertes Material) zur Verwendung als Trägermaterial vorgeschlagen, die aus hochgereinigten ganzen Zellen bzw. Zellverbänden von Pflanzen bestehen.

Die übrigenbleibenden Zellwände bestehen dabei nur noch aus natürlichen Polysacchariden, was mit entscheidenden Vorteilen verbunden ist. Der leere Innenraum (Vesikel) kann Flüssigkeiten und darin gelöste Substanzen aufnehmen.

Die Herstellung und allgemeine Verwendung solchen Materials als chromatographisches Medium wurde bereits dem DD-Patent 247 570 offenbart.

Ein solches Material kann im Gegensatz zu den konventionellen Materialien als voll-biologisch bezeichnet werden. Während die Oberflächen konventioneller Trägermaterialien mehr oder weniger regelmäßig geformt sind, stellen die Oberflächen von vesikulären Materialien geometrisch komplexe, quasi-natürliche fraktale Gebilde dar, wodurch die Adhäsion von Zellen begünstigt wird.

Das erfindungsgemäße modifizierte Trägermaterial kann nach folgendem Verfahren hergestellt werden: Trockenes vesikuläres Material wird auf eine Partikelgröße (Korngröße) von 20 bis 300 μm gesiebt; bevorzugt ist eine Partikelgröße zwischen 60 und 125 μm . Das abgesiebte Material wird mit einer 10 - 50. millimolaren NaIO_4 -Lösung - deren pH-Wert sauer eingestellt ist - versetzt, deren Menge so abgemessen ist, daß das getrocknete vesikuläre Material darin quellen kann. Man läßt das Material zwischen 30 und 180 Minuten in dieser Lösung oxidieren und wäscht es anschließend mehrmals mit Wasser - möglichst destilliertem Wasser - aus. Bevorzugtes Oxidationsmittel ist eine

0.15 molare Phosphat-Pufferlösung (pH = 4,5), die 20 mMol/ltr NaIO_4 enthält, wobei das vesikuläre Material 60 Minuten mit dieser Lösung behandelt wird.

Das so behandelte und gewaschene Material wird dann in verdünnter wässriger Proteinlösung über Nacht inkubiert, wobei die Konzentration der Proteinlösung wie auch die Temperatur der Proteinlösung je nach Protein einzustellen ist. Hinsichtlich der Temperaturbedingungen sollte Raumtemperatur (ca. 20° C) nicht überschritten werden. Für Collagen erwies sich eine 1 Gew.-%-ige Lösung in Wasser bei einer Behandlungstemperatur von 4° C als günstig. Anschließend wird das mit dem Protein beschichtete vesikuläre Material weiterverarbeitet, in dem es in einer wässrigen Lösung von Glycin oder Glycinamid für ca. 1 Stunde inkubiert wird, z.B. in einer 0.5 molaren wässrigen Glycinlösung. Danach kann die Hydrierung der Azomethin-Bindungen mit einem geeigneten Reduktionsmittel in wässrigem Medium, z.B. mit Natriumborhydrid (NaBH_4 , 0,1 %ig in wässrigem Puffer) für ca. 20 Minuten bei 4° C erfolgen. Bevorzugt ist ein PBS-Puffer, 1 molar, unter Zugabe von trockenem Puffermaterial zur Konstanthaltung des pH-Wertes. Anschließend wird das Material wieder gut mit Wasser gewaschen, der nun fertige Mikrocarrier wird in wässriger 0.9 Gew.-% NaCl -Lösung suspendiert. Ein weiterer wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Mikrocarriers ist es, daß er ausschließlich aus biologischem Material besteht und daß seine Herstellung im Vergleich zu den bisher bekannten Carriern für lebende Zellen einfacher und kostengünstiger ist. Erfindungsgemäß wird ein solches vesikuläres Material so modifiziert, daß eine die Adhäsion fördernde Substanz kovalent auf der fraktalen Oberfläche des vesikulären Materials gebunden ist. Solche adhäsionsfördernden Stoffe sind bekannt, so z.B. Proteine und Peptide insbesondere Collagen, wie z.B. Collagen R oder natives Collagen, Laminin und vi greenforms. Der erfindungsgemäße Mikrocarrier kann als Trägermaterial für verankerungsbedürftige, lebende Zellen verwendet werden. Die Präparation derartiger Systeme mit lebenden Zellen sind aus dem Stand der Technik bekannt.

Aufgrund der Materialeigenschaften von ZSM erfolgt die Sterilisierung bevorzugt durch Gamma-Bestrahlung (Dosis 5 - 10 kGy). Zur Vermeidung von strahlungsbedingten Schäden am Carrier (Radikalreaktionen) können der Suspensionslösung 0.1 % oder mehr Histidin oder Histidinamid oder andere Radikalfänger zugesetzt werden.

Anstelle von kovalent gebundenen Collagen kann der erfindungsgemäße Mikrocarrier auch andere Proteine oder Peptide als Adhäsionsfaktoren kovalent gebunden enthalten. Beispielhaft seien genannt:

- Laminin (Glycoprotein, Mr ca. 10^6 ; für Epidermal- u. Endothelialzellen).
- poly-D-Lysin (Mr 30 - 70.000 bzw. 70-150.000).

Tierische Zellen, die beispielsweise auf dem erfindungsgemäßen Mikrocarrier wachsen können, sind:

- V79 Hamsterlungen-Fibroblasten,
- Humanendothelialzellen,
- Hamsternierenzellen,
- Goldhamsterovarialzellen,

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne sie in ihrem Umfang einzuschränken.

Präparation des vesikulären Trägermaterials (Beispiele)

Hier: Zuckerrüben-Material

1. Zellaggregate aus der Zellkultur mit Leitungswasser gut waschen.
2. Phosphorsaures EtOH (1 ml Phosphorsäure pro 1 l 80 - 90 % EtOH) in die Packung aus Zellaggregaten hineinwaschen. Für eine Packung von 3 - 4 l werden ca. 7 l angesäuerten EtOH benötigt. EtOH wird am Ablauf zur Regeneration aufgefangen, sobald der ablaufende Extrakt klar und stark gelb gefärbt ist. Die Extraktion wird danach mit 96 % EtOH fortgesetzt, bis die Zellaggregate entfärbt sind und der Extrakt farblos abläuft (ca. 6 l).
3. Die EtOH-feuchte Packung wird nun mit 6 l 1 % Phosphorsäure (mit Na_2HPO_4 auf pH 2.5 gebracht) gespült. Die Spülung ist beendet, wenn der ablaufende EtOH einen Wassergehalt von ca. 40 % aufweist.
4. Anschließend wird die Packung mit je 3 l Aqua dest. zweimal aufgerührt und unter Rühren bis zum Festwerden drainiert. Anschließend wird mit 3 l Aqua dest. im Festbett eluiert.
5. Die Packung wird unter Zugabe von Aqua dest. auf ein Suspensionsvolumen von ca. 6 l gebracht. Die Suspension wird nun auf pH 6.5 gebracht und mit 7 g KCl versetzt. In die Suspension werden 0.3 l Trypsinlösung (ca. 23 g/l) eingerührt.
6. Ansatz 24 Stunden unter langsamem Rühren auf 20 - 25 °C halten. Danach nochmals 0.3 l Trypsinlösung wie unter (5) zugeben.
7. Nach ca. 48 Stunden Zugabe von 5 ml eines neutral reagierenden ionischen Tensids (Konzentrat). Nachspülen mit Aqua dest.
8. Die wasserfeuchte Packung wird nun mit ca. 6 l 0.5 % NaCl-Lösung gewaschen. Packung danach in 3 l Soerensen-Puffer (pH 7) suspendieren und der Puffer ablaufen lassen. In die Packung nun 3 l Aqua dest. einziehen lassen.

9. Der Ansatz nach (8) kann nun einer Naßsiebung zugeführt werden oder nach Trocknung im Luftstrom einer Trockensiebung zugeführt werden.

Präparation des vesikulären Trägermaterials (Beispiel)

Hier: Kohl-Material

1. Gewaschener Kohl wird entblättert und gehäckselt. Danach gut mit Leitungswasser waschen.
2. 100 - 120 kg gehäckselte Masse werden in angesäuertem Wasser (400 l H_2O + 1 l H_3PO_4 + 0.2 kg Na_2HPO_4) inkubiert (24 - 48 h, 4-10 °C). Ablauf und Waschen mit EtOH (50 %, dann 70 %).
3. Nach Ablauf der wässrigen EtOH-Ablauge wird mit ca. 60 °C heißem 80 - 90 % EtOH extrahiert. Dabei werden Lipidbestandteile herausgelöst und Wasser verdrängt.
4. Pflanzenmasse mit Wasser waschen. Nach Ablauf des Waschwassers Masse in 100 Liter Trypsinlösung (enthält ca. 0.04 kg Trypsin) suspendieren und ca. 48 - 60 Stunden bei 20 - 25 °C langsam rühren. Die Suspensionslösung sollte einen pH von 6.5 aufweisen.
5. Nach Ablauf der Suspensionslösung wird die Packung unter Rühren mehrmals gewaschen, bis der Ablauf Ninhydrin-negativ ist.
6. Die Masse wird nun vermoost, nochmals gewaschen (Wasser) und mit EtOH (Gradient 50 - 70 - 80 - 90 - 96 %) entwässert.
7. Die Trocknung erfolgt im warmem Luftstrom. Anschließend kann das Trockenmaterial vermahlen werden.

1. Entfärbung und Lipidextraktion

- 1.1 Die Zellaggregate werden im Siebgefäß gesammelt und mit Leitungswasser gewaschen (dabei ohne Unterdruck arbeiten).
- 1.2 Die Zellaggregate werden mit phosphorsaurem Ethanol (1 ml Phosphorsäure pro 1 l 80 - 90 %iges Ethanol) entfärbt. Dazu wird das angesäuerte Ethanol zunächst zweimal in kleinen Mengen (weniger als 10 % des Packungsvolumens) auf die Packung gegeben. Bevor das erste Mal Ethanol zugegeben wird, sollte das Wasser noch in geringer Menge über der Packung stehen, damit anfangs ein Ethanolgradient durch die Packung läuft. Nachdem etwa 0.5 l sauren Ethanols in die Packung eingedrungen sind, wird das Material mit 6 l des angesäuerten Ethanols überschichtet. Es wird ohne Unterdruck im Festbett extrahiert. Das Ethanol wird am Ablauf zur Regeneration aufgefangen, sobald der

ablaufende Extrakt klar und stark gelb gefärbt ist. Die Extraktion wird danach mit 96 %igem Ethanol fortgesetzt, bis die Zellen entfärbt sind und der Extrakt farblos abläuft (ca. 6 l).

2. Enzymatische Protoplasma-Solubilisierung und Extraktion (bezogen auf 3-4 l Packungsvolumen)

2.1 Die ethanolhaltige Packung wird mit 6 l 1%igen Phosphorsäurepuffers gespült. Die erforderliche Menge wird bereitet, indem 1%ige Phosphorsäure (techn.) bei potentiometrischer Kontrolle des pH mit gesättigter Na_2HPO_4 -Lösung auf pH 2,5 gebracht wird. Das ablaufende Ethanol wird aufgefangen. Es wird ohne Unterdruck gearbeitet. Zunächst wird eine geringe Menge des Puffers in die Packungsoberfläche gerührt, solange etwas Ethanol über der Packung steht. Bei diesem Vorgang kommt es darauf an, Klumpenbildung an der Oberfläche zu vermeiden. Nach dem Festwerden der Packung wird 2x mit je 3 l des Phosphorsäurepuffers überschichtet, und das Ethanol wird gesammelt, bis es einen Wassergehalt von 40 % aufweist (Spindel).

2.2 Anschließend wird die Packung mit je 3 l Aqua dest. zweimal aufgerührt und unter Rühren bis zum Festwerden drainiert, anschließend mit 3 l Aqua dest. im Festbett eluiert.

2.3 Die feuchte Masse wird in ein 10 l-Gefäß überführt. Am Siebgefäß anhaftende Reste werden mit dest. Wasser in das gleiche Gefäß gespült. Durch Zugabe von Aqua dest. wird das Volumen der Suspension auf ca. 6 l gebracht. Bei potentiometrischer Kontrolle wird die Suspension mit gesättigter Na_2HPO_4 -Lösung auf pH 6,5 gebracht, danach werden 7 g KCl und 3 g NaN_3 in die Suspension gerührt. 7 g Trypsin zur Zellzucht (Firma Belger, Kleinmachnow) werden in 0,3 l Aqua dest gut verrührt und in die Suspension der Zellaggregate gemischt. Das Gefäß wird abgedeckt und bei Zimmertemperatur (20 - 25 °C) aufgestellt. Nach 24 h werden weitere 7 g Trypsin in oben beschriebener Weise zugegeben.

2.4. Nach etwa 48 h werden die Zellaggregate gewaschen. Hierzu gibt man 5 ml eines konzentrierten neutral reagierenden Spülmittels (Natriumalkylsulfonat) zu der Suspension, überführt sie vollständig mit Nachspülen (Aqua dest.) in das Siebgefäß, läßt die Masse absetzen und verrührt sie zweimal mit 3 l 0,5 %iger NaCl-Lösung. Anschließend wird die Masse abgedeckt und als geschlossene Packung mit 6 l NaCl-Lösung (0,5 %) gewaschen. Hieran schließt sich ein Aufrühren mit 3 l 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 (Soerensen) an. Nach dem Festwerden läßt man 3 l Aqua dest. einziehen

und benetzt anschließend die Oberfläche mit Ethanol. Beim Einziehen des Ethanols wird die Packung an der Oberfläche leicht verrührt und anschließend mit 80 - 90 %igem Ethanol (1,5 l) überschichtet. Nach dem Einziehen des 80 - 90 %igen Ethanols wird 96 %iges Ethanol (4 l) zugegeben. Das Ethanol läuft ohne Unterdruck durch die Packung. Das durchlaufende Ethanol wird gesammelt, sobald es eine Konzentration von > 60 % erreicht hat.

3. Trocknen

Die ethanolhaltige Masse wird auf einer großen Filternutsche durch den Unterdruck einer Wasserstrahlpumpe vom beweglichen Teil des Ethanols befreit. Dabei wird die Masse mit einem Plastspatel an den Rand der Nutsche gepreßt. Sie wird anschließend mit 1 l einer Mischung aus 96 %igem Ethanol und n-Butanol überschichtet (Verhältnis 10/1). Nach dem Einziehen der Ethanol/Butanol-Mischung wird die Packung trockengesaugt, wobei das Pulver an der Oberfläche gelockert und an den Rand der Nutsche gepreßt wird, damit das Alkoholgemisch gleichmäßig abgesaugt werden kann. Der in der Saugflasche gesammelte Alkohol wird zur Destillation gesammelt. Das gut abgesaugte, alkoholfeste Pulver wird im Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. Hierbei ist darauf zu achten, daß sich im Rundkolben eine Schlaufe aus elastischem Material (z.B. Polyamidseil) befindet, damit das Pulver gut bewegt wird und sich keine Klumpen bilden können. Klumpenbildung kann durch vorheriges Sieben des feuchten Pulvers vollständig vermieden werden. Der Kolben des Rotationsverdampfers wird mit einem Wasserbad erwärmt (Wassertemperatur 70 °C). Der Rundkolben ist zu einem Drittel mit dem Material zu füllen. Am Kolbenhals muß sich ein Filter aus Polyamidseide befinden, dessen Aufgabe darin besteht, das Herausaugen des trockenen Pulvers aus dem Rundkolben zu verhindern.

Präparation eines Derivats des vesikulären Trägermaterials aus Zuckerrüben

Hier: Collagen-Derivat (Beispiel)

1. Naßgesiebte Zellaggregate (150 - 300 µm) in Periodat-Lösung suspendieren (50 mM NaIO_4 + 500 ml MERCK-Puffer pH 4 + 2000 ml Aqua dest., R.T.). Auf 2,5 l der Periodat-Lösung sollten nicht mehr als ca. 1 kg wasserfeuchte Zellmasse kommen.

2. Ansatz bei R.T. und im Dunkeln ca. 1 Stunde langsam rühren.

3. Ansatz abfiltrieren und gut mit Aqua dest. waschen.

4. Die Feuchtmasse in ca. 1 l Collagen-Lösung (0.3-1%) inkubieren und über Nacht bei 4°C langsam rühren.

5. Danach gut mit Aqua dest. waschen.

6. 2.5 g NaBH₄ in 1.5 l MERCK-Puffer pH 7 lösen. In frische Lösung die Pflanzenzellmasse einrühren und ca. 30 Minuten bei ca. 10°C langsam weiterrühren. Anfangs-pH ca. 8, End-pH ca. 9.

7. Ansatz gut mit Aqua dest. waschen und fertiges Material wasserfeucht in 0.9 % NaCl-Lösung suspendieren. Danach Bestrahlung (Gamma, ca. 7 kGy).

Beispiel für die Kultivierung von lebenden Zellen auf dem erfindungsgemäßen Carriermaterial:

Zelllinien: CHO-K1 (ATCC CCL 61); BHK 21 (c-13) (ATCC CCL 10)

Die oben genannten Zelllinien wurden ausgewählt, weil sie als Ausgangszelllinien vieler genetisch modifizierter Zelllinien zur Herstellung von zahlreichen rekombinaten Produkten wie AT III, Faktor VIII, Interleukine und Interferone dienen. In der Regel unterscheiden sich diese Ausgangszelllinien hinsichtlich ihrer Anheftungseigenschaften nicht sehr von den genetisch modifizierten Produktionszelllinien. Die mit den Ausgangszelllinien ermittelten Daten lassen sich daher auf die meisten Produktionszelllinien übertragen.

Versuche in Spinnerflaschen:

Carrierkonzentration:

63 g l⁻¹ Zuckerrüben-ZSM-Collagen-Gel,

Reaktionsvolumen: 100 bzw. 500 ml

Drehzahl: 40 Upm

Temperatur: 37°C, Brutschrank mit 7.5 % CO₂, Luft und 95 % Luftfeuchtigkeit

pH: 7.0 - 6.6

Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 80 vol%, Tryptose-phosphate-broth 10 vol% und Fötale Kälberserum (FCS) 10 vol% Animpfkonzentration:

2 x 10⁵ Zellen ml⁻¹

Versuche im Fermenter:

Carrierkonzentration: 63 g l⁻¹

Zuckerrüben-ZSM-Collagen-Gel

Drehzahl: 45 Upm

Temperatur: 37°C

pH: 6.9

pO₂: 40 % Luftsättigung

Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 80 vol%, Tryptose-phosphate-broth 10 vol% und Fötale Kälberserum (FCS) 10 vol%

Reaktionsvolumen: 2.2 l

Analytik:

Glukose und Laktat wurden enzymatisch mit einem

Analysator der Firma YSI bestimmt. Die freien Zellen, die nicht auf dem Carrier gebunden sind, wurden direkt im Haemocytometer gezählt. Für die carrier-gebundenen Zellen wurden die Zellen bei den Vesipormaterialien mit Trypsin/EDTA-Lösung von den Trägern abgelöst und dann im Haemocytometer gezählt.

Figur 1 zeigt das Wachstumsverhalten von CHO-K1-Zellen auf Zuckerrüben-ZSM-Collagen.

Figur 2 zeigt das Wachstumsverhalten von BHK 21 Zellen im Fermenter, ebenfalls auf Zuckerrüben-ZSM-Collagen.

Patentansprüche

1. Mikrocarrier für lebende Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß er ein vesikuläres Material mit mindestens einer adhäsionsfördernden Substanz enthält.
2. Mikrocarrier nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das vesikuläre Material eine Partikelgröße (trocken) zwischen 20 und 300 µm sowie eine fraktale Oberfläche (gequollener Zustand) aufweist.
3. Mikrocarrier nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die adhäsionsfördernde Substanz ein Protein oder Peptid ist.
4. Mikrocarrier nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die adhäsionsfördernde Substanz ein Collagen, Laminin oder poly-D-Lysin ist.
5. Verwendung von vesikulärem Material zur Herstellung von Mikrocarriern für lebende Zellen.
6. Verfahren zur Herstellung von Mikrocarriern für lebende Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß ein getrocknetes vesikuläres Material mit einer für lebende Zellen adhäsionsfördernden Substanz kovalent verknüpft wird.

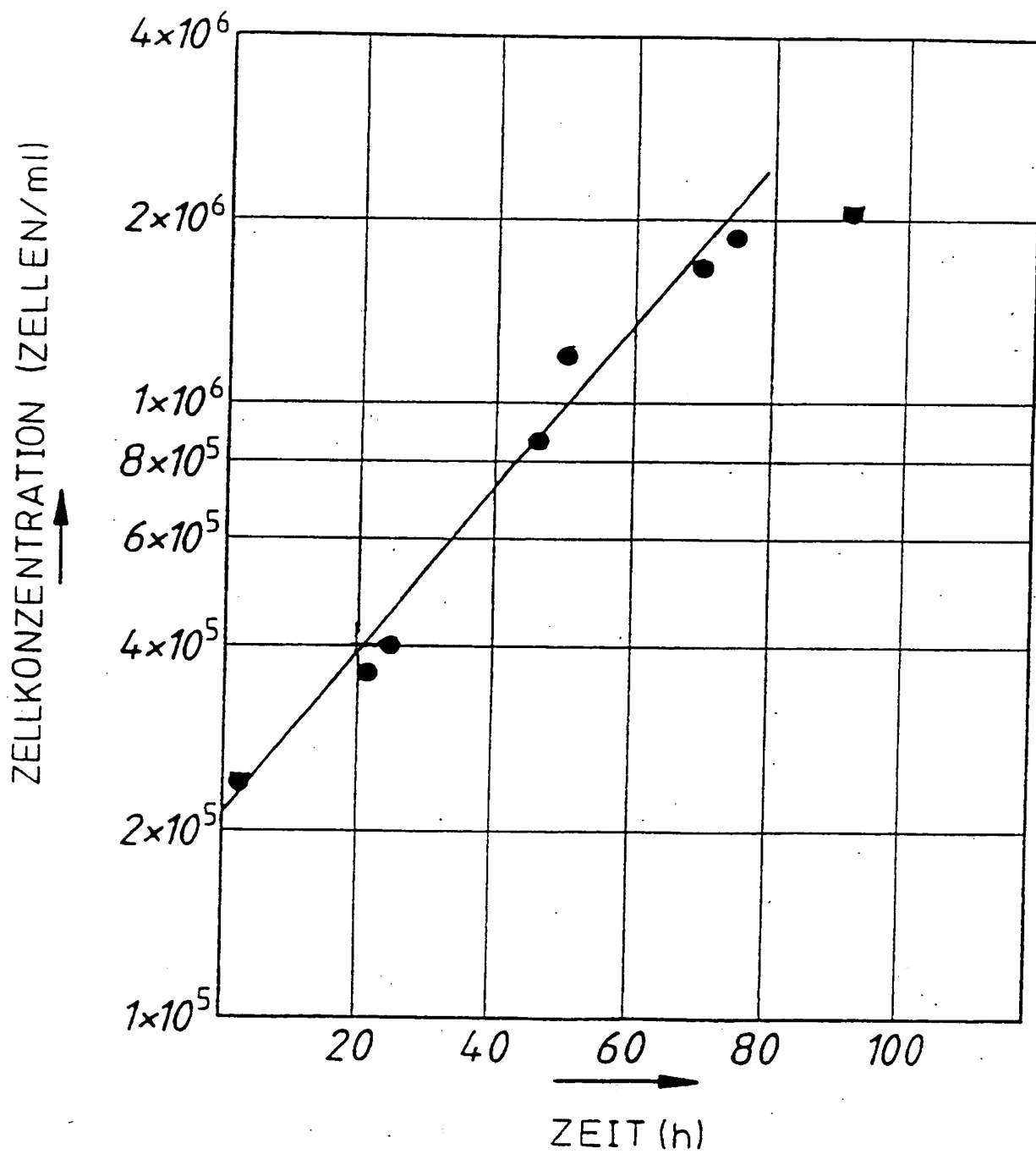


fig. 1:
Kultivierung von CHO-K1 im Spinner:

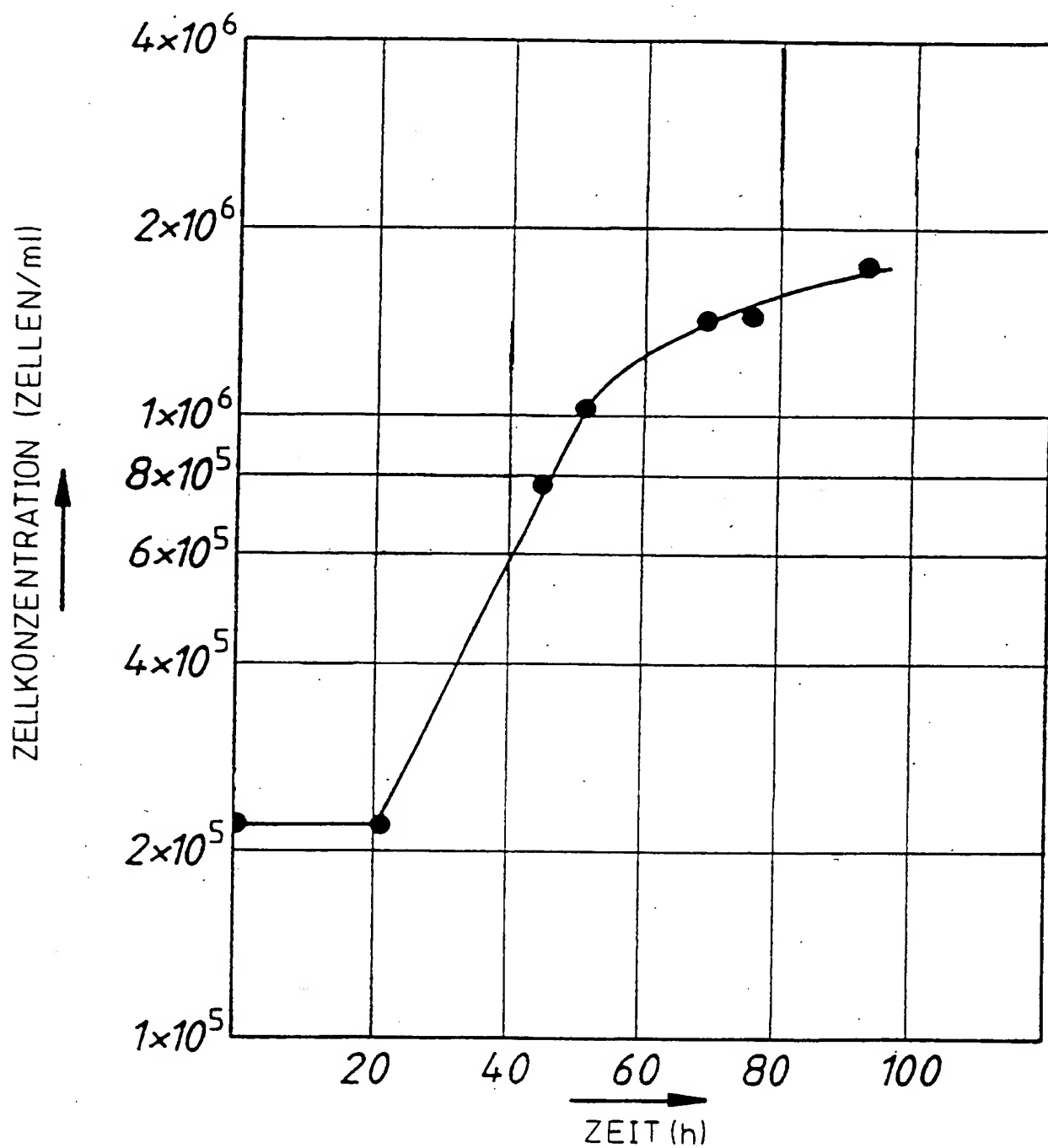


fig. 2

Kultivierung von BHK 21 im Fermenter:



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 12 0111

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	ABSTRACTS OF PAPERS AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 192 ND ACS NATIONAL MEETING ,MBT0106 1986, ANAHEIM US CAHN F. ET AL.: 'Porous microcarrier particles for mammalian cell culture' * Zusammenfassung *	1,3-6	C12N5/00 C12N5/06
X	TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 8, Nr. 5, Mai 1990, CAMBRIDGE GB Seiten 131 - 136; CAHN F.: 'Biomaterials aspects of porous microcarriers for animal cell culture' * das ganze Dokument *	1-6	
X	BIOPHARM Bd. 3, Nr. 7, August 1990, Seiten 20 - 23; ADEMA E. ET AL.: 'Use of porous microcarriers in agitated cultures' * das ganze Dokument *	1,3-6	
X	WO-A-8 605 811 (VERAX CORPORATION) * Zusammenfassung; Ansprüche 1-13,27 *	1-6	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
A	DE-A-3 347 512 (HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN) * das ganze Dokument *	1-6	C12N
A	DE-A-3 629 692 (HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN) * das ganze Dokument *	1-6	
A	WO-A-8 700 197 (KARYON TECHNOLOGY, INCORPORATED) * Ansprüche 1-5,12-13,19,20 *	1-6	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchesort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 05 MAERZ 1992	Prüfer GURDJIAN O.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

The invention relates to a modified carrier material as microcarrier for cells which require anchoring, especially for mammalian cells.

It was known in the prior art to use carriers having glass or synthetic surfaces for cells which require anchoring. Scaling up in this case is achieved by simply enlarging the surfaces.

Since 1967, microcarriers have been employed as alternative for the growing and culturing of cells which require anchoring. Various materials (glass, synthetics, crosslinked polysaccharides) serve as carrier material. Adhesion was decisively improved by chemical modification of the carrier surfaces. In most cases, for this purpose collagen is covalently bonded to the surfaces of the carriers. Scaling up in the case of microcarriers takes place by simple addition of fresh carrier material; in this case cells migrate from previously colonized carriers to the fresh carriers.

The invention proposes a novel class of derivatized vesicular materials (CSM = cell-structured material) which consist of highly purified whole cells or assemblages of cells of plants for use as carrier material.

The remaining cell walls consist, in this case, only of natural polysaccharides, with associated decisive advantages.

The empty interior (vesicle) can take up liquids and substances dissolved therein.

The preparation and general use of such materials as chromatographic medium has already been disclosed in DD patent 247 570.

Such a material can, in contrast to conventional materials, be referred to as completely biological. Whereas the surfaces of conventional carrier materials have a more or less regular shape, the surfaces of vesicular materials represent geometrically complex, quasi-natural fractal structures, thus favoring the adhesion of cells.

The modified carrier material according to the invention can be prepared by the following processes: dry vesicular material is screened to a particle size of from 20 to 300 μm ; a particle size between 60 and 125 μm is preferred. The screened material is mixed with a 10-50 millimolar NaIO_4 solution - whose pH is adjusted in the acid range - and whose amount is such that the dried vesicular material can swell therein. The material is left to oxidize in this solution for between 30 and 180 minutes and is then washed several times with water - if possible distilled water. The preferred oxidizing agent is a 0.15 molar phosphate buffer solution (pH = 4.5) which contains 20 mmol/l NaIO_4 , the vesicular material being treated with this solution for 60 minutes.

The material treated and washed in this way is then

incubated in dilute aqueous protein solution overnight, adjusting the concentration of the protein solution and the temperature of the protein solution according to the protein. Concerning the temperature conditions, room temperature (about 20°C) should not be exceeded. For collagen, a 1% by weight solution in water with a treatment temperature of 4°C proved to be favorable. The vesicular material coated with the protein is then processed further by incubating it in an aqueous solution of glycine or glycinamide for about 1 hour, e.g. in a 0.5 molar aqueous glycine solution. The hydrogenation of the azomethine linkages can then take place with a suitable reducing agent in aqueous medium, e.g. with sodium borohydride (NaBH_4 , 0.1% in aqueous buffer) at 4°C for about 20 minutes. A 1 molar PBS buffer is preferred, with addition of dry buffer material to keep the pH constant. The material is then again thoroughly washed with water, and the now complete microcarrier is suspended in aqueous 0.9% by weight NaCl solution. A further considerable advantage of the microcarrier according to the invention is that it consists exclusively of biological material, and that its preparation is simpler and more cost effective by comparison with previously disclosed carriers for living cells. Such a vesicular material is modified according to the invention in such a way that an adhesion-promoting substance is covalently bonded to the fractal surface of the vesicular material. Such

adhesion-promoting substances are known, e.g. proteins and peptides, especially collagen, such as, for example, collagen R or native collagen, laminin and vi greenforms. The microcarrier according to the invention can be used as carrier material for living cells which require anchoring. The preparation of such systems with living cells are known in the prior art.

Owing to the material properties of CSM, sterilization preferably takes place by gamma radiation (dose 5-10 kGy). To avoid radiation damage to the carrier (free radical reactions), 0.1% or more histidine or histidinamide or other free radical scavengers can be added to the suspension solution.

Instead of covalently bonded collagen, the microcarrier according to the invention may also comprise other proteins or peptides covalently bonded as adhesion factors. Examples which may be mentioned are:

- laminin (glycoprotein, Mr about 10^6 ; for epidermal and endothelial cells),

- poly-D-lysine (Mr 30-70 000 or 70-150 000).

Animal cells which are able to grow for example on the microcarrier according to the invention are:

- V79 hamster lung fibroblasts,

- human endothelial cells,

- hamster kidney cells,

- golden hamster ovarian cells.

The following examples are intended to explain the invention without restricting its scope.

Preparation of the vesicular carrier material (examples)

Here: sugar beet material

1. Thoroughly wash cell irrigates from the cell culture with tap water.

2. Rinse phosphoric acid/EtOH (1 ml of phosphoric acid per 1 l of 80-90% EtOH) into the packing of cell aggregates. About 7 l of acidified EtOH are required for a packing of 3-4 l. EtOH is collected at the outflow for regeneration as soon as the effluent extract is clear and deep yellow in color. The extraction is then continued with 96% EtOH until the cell aggregates are discolored and the extract effluent is colorless (about 6 l).

3. The EtOH-moist packing is then rinsed with 6 l of 1% phosphoric acid (adjusted to pH 2.5 with Na_2HPO_4). The rinsing is complete when the effluent EtOH has a water content of about 40%.

4. The packing is then stirred twice with 3 l of distilled water each time, draining with stirring until compacted. 3 l of distilled water is then used for elution in the fixed bed.

5. The packing is brought to a suspension volume of about 6 l by adding distilled water. The suspension is then adjusted

to pH 6.5, and 7 g of KCl are added. 0.3 l of trypsin solution (about 23 g/l) is stirred into the suspension.

6. Keep the mixture at 20-25°C with slow stirring for 24 hours. Then again add 0.3 l of trypsin solution as in (5).

7. After about 48 hours, addition of 5 ml of a neutrally reacting ionic surfactant (concentrate). Rinsing with distilled water.

8. The water-moist packing is then washed with about 6 l of 0.5% NaCl solution. Then suspend the packing in 3 l of Soerensen buffer (pH 7) and allow the buffer to flow off. Then allow the packing to absorb 3 l of distilled water.

9. The mixture from (8) can then be subjected to a wet screening or, after drying in a stream of air, subjected to a dry screening.

Preparation of the vesicular carrier material (example)

Here: cabbage material

1. The leaves are removed from washed cabbage and shredded. Then thoroughly wash with tap water.

2. 100-120 kg of shredded material are incubated in acidified water (400 l of H_2O + 1 l of H_3PO_4 = 0.2 kg of Na_2HPO_4) (24-48 h, 4-10°C). Drain and wash with EtOH (50%, then 70%).

3. After the aqueous EtOH effluent has flowed off, extraction is carried out with 80-90% EtOH at about 60°C. During this, lipid constituents are dissolved out and water

is displaced.

4. Wash plant material with water. After the washing water has flowed off, suspend material in 100 liters of trypsin solution (contains about 0.04 kg of trypsin) and stir slowly at 20-25°C for about 48-60 hours. The suspension solution should have a pH of 6.5.

5. After the suspension solution has flowed off, the packing is washed several times with stirring until the effluent is ninhydrin-negative.

6. The material is then mossed, washed again (water) and dehydrated with EtOH (gradient 50 - 70 - 80 - 90 - 96%).

7. Drying takes place in the stream of hot air. The dry material can then be ground.

1. Decolorization and lipid extraction

1.1 The cell aggregates are collected in the screening vessel and washed with tap water (operating without reduced pressure).

1.2 The cell aggregates are decolorized with phosphoric acid/ethanol (1 ml of phosphoric acid per 1 of 80-90% ethanol). For this purpose, the acidified ethanol is firstly put twice in small amounts (less than 10% of the packing volume) onto the packing. Before ethanol is added for the first time, a small amount of water should still be present on top of the packing so that initially an ethanol gradient flows through

the packing. After about 0.5 l of acidic ethanol has penetrated into the packing, the material is covered with 6 l of the acidified ethanol. Extraction is carried out in the fixed bed without reduced pressure. The ethanol is collected at the outflow for regeneration as soon as the effluent extract is clear and deep yellow in color. The extraction is then continued with 96% ethanol until the cells are decolorized and the effluent extract is colorless (about 6 l).

2. Enzymatic protoplasm solubilization and extraction (based on a packing volume of 3-4 l)

2.1 The ethanol-containing packing is rinsed with 6 l of 1% phosphoric acid buffer. The required amount is prepared by adjusting 1% phosphoric acid (techn.) to pH 2.5 with saturated Na_2HPO_4 solution, monitoring the pH by potentiometry. The effluent ethanol is collected. Operations are performed without reduced pressure. Firstly, a small amount of the buffer is stirred into the packing surface as long as there is some ethanol on top of the packing. The aim in this procedure is to avoid formation of lumps on the surface. After the packing has compacted it is covered 2x with 3 l of phosphoric acid buffer each time, and the ethanol is collected until it has a water content of 40% (spindle).

2.2 The packing is then stirred twice with 3 l of distilled water each time, draining with stirring until

compacted, and then eluted with 3 l of distilled water in the fixed bed.

2.3 The moist material is transferred into a 10 l vessel. Residues adhering to the screening vessel are rinsed with distilled water into the same vessel. The volume of the suspension is adjusted to about 6 l with distilled water. The suspension is adjusted to pH 6.5 with saturated Na_2HPO_4 solution, monitoring by potentiometry, and then 7 g of KCl and 3 g of NaN_3 are stirred into the suspension. 7 g of trypsin for cell culturing (from Belger, Kleinmachnow) are thoroughly stirred in 0.3 l of distilled water and mixed into the suspension of cell aggregates. The vessel is covered and kept at room temperature (20-25°C). After 24 h, a further 7 g of trypsin are added in the manner described above.

2.4 After about 48 h, the cell aggregates are washed. For this purpose, 5 ml of a concentrated neutrally reacting rinsing agent (sodium alkylsulfonate) are added to the suspension, the latter is transferred completely into the screening vessel with rinsing (distilled water), and the material is allowed to settle and is stirred twice with 3 l of 0.5% NaCl solution. The material is then covered and washed as closed packing with 6 l of NaCl solution (0.5%). This is followed by stirring with 3 l of 0.1M phosphate buffer of pH 7 (Soerensen). Compaction is followed by absorption of 3 l of distilled water, and then the surface is wetted with ethanol.

While the ethanol is absorbing, the packing is gently stirred on the surface and then covered with 80-90% ethanol (1.5 l). After the 80-90% ethanol has been absorbed, 96% ethanol (4 l) is added. The ethanol runs through the packing without reduced pressure. The ethanol flow-through is collected as soon as it has reached a concentration of > 60%.

3. Drying

The ethanol-containing material is freed of the mobile part of the ethanol on a large filter funnel with the reduced pressure of a water pump. During this, the material is pushed to the edge of the funnel with a plastic spatula. It is then covered with 1 l of a mixture of 96% ethanol and n-butanol (ratio 10/1). After absorption of the ethanol/butanol mixture, the packing is sucked dry, loosening the powder on the surface and pushing it to the edge of the funnel so that the alcohol mixture can be sucked out uniformly. The alcohol collected in the suction bottle is collected for distillation. The thoroughly suction-treated, alcohol-moist powder is dried in a vacuum rotary evaporator. Care must be taken during this that a loop of elastic material (e.g. nylon line) is present in the round-bottomed flask so that the powder is thoroughly agitated and no lumps can form. Formation of lumps can be completely prevented by previous screening of the moist powder. The flask of the rotary evaporator is heated with a water bath (water

temperature 70°C). The round-bottomed flask should be one third full with the material. A fine nylon filter must be located at the neck of the flask to prevent the dry powder being sucked out of the round-bottomed flask.

Preparation of a derivative of the vesicular carrier material from sugar beet

Here: collagen derivative (example)

1. Suspend wet-screened cell aggregates (150-300 μm) in periodate solution (50 mm of NaIO_4 + 500 ml of MERCK buffer pH 4 + 2000 ml of distilled water, R.T.). There should be no more than about 1 kg of water-moist cell material for 2.5 l of the periodate solution.

2. Stir mixture at R.T. and in the dark slowly for about 1 hour.

3. Filter the mixture and thoroughly wash with distilled water.

4. Incubate the moist material in about 1 l of collagen solution (0.3-1%) and stir slowly at 4°C overnight.

5. Then thoroughly wash with distilled water.

6. Dissolve 2.5 g of NaBH_4 in 1.5 l of MERCK buffer pH

7. Stir the plant cell material into fresh solution and continue stirring slowly at about 10°C for about 30 minutes. Initial pH about 8, final pH about 9.

7. Thoroughly wash mixture with distilled water and

suspend finished material water-moist in 0.9% NaCl solution.
Then irradiate (gamma, about 7 kGy).

Example of culturing living cells on the carrier material
according to the invention:

Cell lines: CHO-KI (ATCC CCL 61); BHK 21 (c-13) (ATCC CCL 10)

The abovementioned cell lines were selected because they,
as starting cell lines of many genetically modified cell lines,
are used for producing numerous recombinant products such as
AT III, factor VIII, interleukins and interferons. These
starting cell lines usually do not differ much in their adhesion
properties from the genetically modified producer cell lines.
The data obtained with the starting cell lines can therefore
be applied to most producer cell lines.

Experiments in spinner bottles:

Carrier concentration:

63 g l⁻¹ Sugar beet CSM collagen gel,

Reaction volume: 100 or 500 ml

Revolutions: 40 rpm

Temperature: 37°C, incubator with 7.5% CO₂, air and 95% humidity

pH: 7.0-6.6

Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 80 vol%,
tryptose phosphate broth 10 vol% and fetal calf serum (FCS)
10 vol% inoculation concentration:

2×10^5 cells ml^{-1}

Fermenter experiments:

Carrier concentration: 63 g l^{-1}

Sugar beet CSM collagen gel

Revolutions: 45 rpm

Temperature: 37°C

pH: 6.9

pO_2 : 40% air saturation

Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 80 vol%,
tryptose phosphate broth 10 vol% and fetal calf serum (FCS)
10 vol%

Reaction volume: 2.2 l

Analyses:

Glucose and lactate were determined enzymatically using a YSI analyzer. The free cells not bound to the carrier were counted directly in a hemocytometer. For the carrier-bound cells, the cells in the case of the vesipor materials were detached from the carriers with trypsin/EDTA solution and then counted in a hemocytometer.

Figure 1 shows the growth behavior of CHO-K1 cells on sugar beet CSM collagen.

Figure 2 shows the growth behavior of BHK 21 cells in a fermenter, likewise on sugar beet CSM collagen.

Claims

1. Microcarrier for living cells, characterized in that it comprises a vesicular material with at least one adhesion-promoting substance.
2. Microcarrier according to Claim 1, characterized in that the vesicular material has a particle size (dry) of between 20 and 300 μm , and a fractal surface (swollen state).
3. Microcarrier according to Claim 1 or 2, characterized in that the adhesion-promoting substance is a protein or peptide.
4. Microcarrier according to Claim 3, characterized in that the adhesion-promoting substance is a collagen, laminin or poly-D-lysine.
5. Use of vesicular material for producing microcarriers for living cells.
6. Process for producing microcarriers for living cells, characterized in that a dried vesicular material is covalently linked to a substance which is adhesion-promoting for living cells.